



**PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES DE LA
NICOTINAMIDE ET DE SES DÉRIVÉS EN
SOLUTION AQUEUSE - 1. ANALYSE CRITIQUE DE
L'ENSEMBLE DES DONNÉES DISPONIBLES
RELATIVES AUX PROPRIÉTÉS
ÉLECTROCHIMIQUES DES DÉRIVÉS DE LA
PYRIDINE EN SOLUTION AQUEUSE**

Daniel R. Thevenot, René Buvet

► **To cite this version:**

Daniel R. Thevenot, René Buvet. PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES DE LA NICOTINAMIDE ET DE SES DÉRIVÉS EN SOLUTION AQUEUSE - 1. ANALYSE CRITIQUE DE L'ENSEMBLE DES DONNÉES DISPONIBLES RELATIVES AUX PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES DES DÉRIVÉS DE LA PYRIDINE EN SOLUTION AQUEUSE. Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry, 1972, 39, pp.429 - 446. hal-01096449

HAL Id: hal-01096449

<https://hal-enpc.archives-ouvertes.fr/hal-01096449>

Submitted on 17 Dec 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution| 4.0 International License

PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES DE LA NICOTINAMIDE ET DE SES DÉRIVÉS EN SOLUTION AQUEUSE

I. ANALYSE CRITIQUE DE L'ENSEMBLE DES DONNÉES DISPONIBLES RELATIVES AUX PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES DES DÉRIVÉS DE LA PYRIDINE EN SOLUTION AQUEUSE*

D. THÉVENOT et R. BUVET

Laboratoire d'Energétique Biochimique, Centre Multidisciplinaire, Université Paris-Val de Marne, Avenue du Général de Gaulle, 94 Créteil (France)

(Reçu le 14 décembre 1971; en forme révisée le 27 avril 1972)

Les coenzymes pyridiniques, c'est-à-dire le nicotinamide-mononucléotide (NMN⁺), le nicotinamide-adenine-dinucléotide (NAD⁺) et le nicotinamide-adenine-dinucléotide phosphate (NADP⁺) (Fig. 1) ainsi que plusieurs autres dérivés pyridiniques, jouent un rôle primordial dans les réactions d'oxydo-réduction biologiques. Pour cette raison de nombreuses données relatives aux propriétés chimiques et électrochimiques des pyridines en solution aqueuse ont déjà été réunies. Dans l'étude critique des données disponibles relatives à ces matériaux d'intérêt biologique,

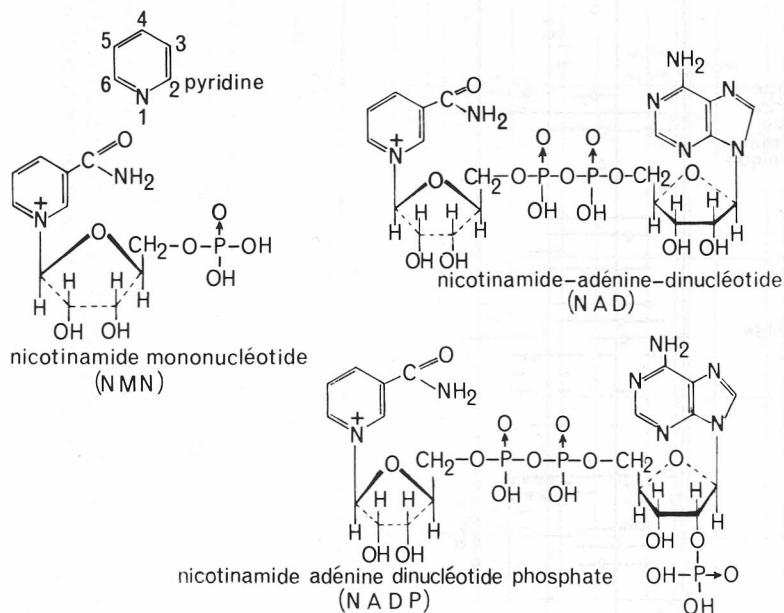


Fig. 1. Formules des nucléotides pyridiniques.

* Partie de la thèse de doctorat d'Etat ès-Sciences Physiques soutenue par Daniel Thévenot le 14 Octobre 1971 à Paris. No. CNRS: A.O. 6164.

que nous développons ci-après, nous prendrons soin de préciser en premier lieu comment les propriétés électrochimiques de ces matériaux se situent parmi celles de l'ensemble des pyridines. Dans une deuxième étape nous examinerons plus en détail les propriétés des pyridines biologiques qui jouent un rôle essentiel dans les réactions d'oxydo-réduction.

1. PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES COMPARÉES DES PYRIDINES SUBSTITUÉES

Les pyridines substituées pour lesquelles on dispose du plus grand nombre de données électrochimiques font intervenir les substituants : $-\text{CH}_3$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{COCH}_3$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CHO}$, $-\text{CN}$ et NO_2 . Fixés sur un cycle pyridinique en position 1, 2, 3 ou 4, ces substituants donnent des dérivés non oxydables mais susceptibles par contre

TABLEAU 1

(—) Domaine d'acidité pour lequel des valeurs de potentiel de réduction sont disponibles ou bien (---) ont été notées comme impossible à obtenir. (==) Domaine d'acidité pour lequel des valeurs de potentiel d'oxydation ont été notées comme impossible à obtenir. (\diamond) Valeurs des pK_a de ces composés en solution aqueuse à la température ambiante^{14,46-49}.

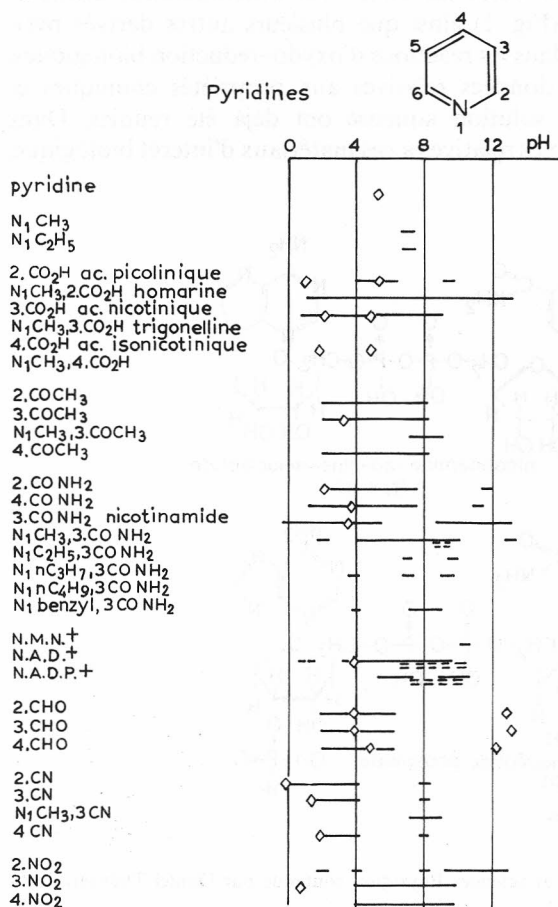
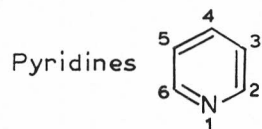
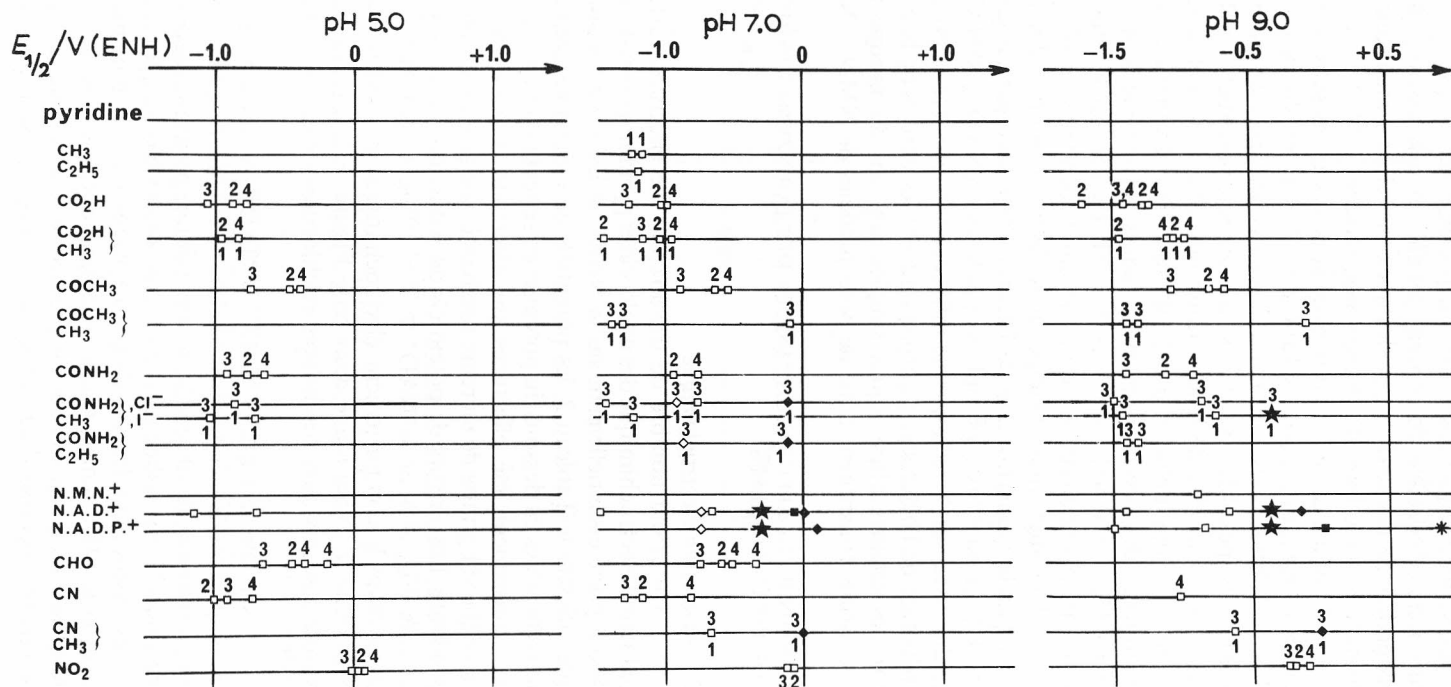


TABLEAU 2

POTENTIELS ÉLECTROCHIMIQUES DES DÉRIVÉS DE LA PYRIDINE EN SOLUTION AQUEUSE À LA TEMPÉRATURE AMBIANTE: EFFET DE LA NATURE ET DE LA POSITION DES SUBSTITUANTS LES PLUS SIMPLES À pH 5,0, 7,0 ET 9,0



Potentiers de réduction relevés (\square) par polarographie classique et (\diamond) par voltamétrie sur goutte de mercure pendante. Potentiers de réoxydation des composés réduits relevés (\blacksquare) par polarographie classique et par voltamétrie cyclique (\blacklozenge) sur goutte de mercure pendante et (*) sur disque de platine. (*) Potentiers d'oxydo-réduction à courant nul d'une électrode de platine plongée dans des mélanges, en quantité équivalente, des formes oxydante et réductrice (1,4-dihydro) d'un même dérivé.



d'être réduits sur électrodes de mercure. Le Tableau 1 présente l'étendue du domaine d'acidité pour lequel des valeurs de potentiel de réduction sont disponibles¹⁻⁴⁵. Les propriétés d'échange de protons jouant un rôle essentiel dans les mécanismes de réduction de ces dérivés pyridiniques, ce tableau mentionne également les pH de transition acide-base des formes non réduites^{14,46-49}.

L'influence de la nature et de la position des substituants sur la réduction des pyridines est illustrée par les Tableaux 2 et 3. Pour plus de précision nous avons porté dans le Tableau 3 les valeurs numériques correspondantes, en les regroupant dans la mesure du possible sous forme de relation potentiel - pH. Tous les substituants notés ont pour effet de rendre moins négatif le potentiel de réduction de la pyridine. Celui-ci est mal défini et proche du mur de réduction des protons^{27-32,60}. L'ordre d'influence décroissante des substituants correspond à la suite: $-\text{NO}_2 > -\text{CHO} > -\text{COCH}_3 > -\text{CONH}_2 > -\text{CN} > -\text{CO}_2\text{H}$. En général les positions occupées par les substituants ont un effet qui diminue dans l'ordre: position 4 > position 2 > position 3.

Une augmentation importante des potentiels de réduction est également provoquée par la quaternisation de l'azote pyridinique par un groupement alkyl ($-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, ...) ou ribose-phosphate-nucléotide (NAD^+ et NADP^+). La nature de la chaîne fixée sur N_1 n'a qu'une influence modérée sur le potentiel de demi-vague de réduction de l'hétérocycle correspondant: les dérivés de la nicotinamide quaternisés par des chaînes aliphatiques simples, au lieu du groupe ribose-pyrophosphate- adénosine, constituent donc de bons modèles de NMN^+ , NAD^+ et NADP^+ .

2. PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES DES COENZYMES PYRIDINIQUES ET DE LEURS COMPOSÉS MODÈLES

2.1. Réduction électrochimique

Un grand nombre de travaux ont été effectués, surtout depuis 1955, sur la réduction électrochimique des nucléotides pyridiniques et de leurs composés modèles; ils ont porté essentiellement sur le NAD^+ et les sels de N_1 -méthyl pyridinium. Ainsi que l'illustre le Tableau 2, les potentiels de réductions sont assez négatifs et le plus souvent situés en dessous du potentiel de réduction théorique de l'eau. Ces études ont, par conséquent, été effectuées sur électrode de mercure, soit par polarographie classique sur goutte de mercure tombante, soit par voltamétrie sur goutte de mercure pendante. Les valeurs de potentiels de réduction ont été répertoriées et rassemblées dans la Fig. 2 pour le $\text{NAD}^{+1-10,23-26}$ et le $\text{NADP}^{+1,10-17,26}$. Les références concernant le comportement électrochimique du NMN^+ sont rares¹: ce composé n'est donc pas mentionné dans cette Figure. Elle présente par contre les nombreux résultats acquis pour les iodures et chlorures de N_1 -méthyl nicotinamide^{6,10,14,18-20,26}.

On constate que le NAD^+ , le NADP^+ et les sels de N_1 -méthyl nicotinamide se comportent de façon semblable lors de la réduction sur électrode de mercure. Dans tout le domaine de pH étudié, il apparaît une première vague de potentiel E_1 indépendante du pH. En milieu neutre ou légèrement basique, il existe, pour les sels de N_1 -méthyl nicotinamide, une deuxième vague dont le potentiel diminue linéairement lorsque le pH augmente. Les potentiels obtenus avec le NAD^+ et le NADP^+ ne diffèrent à un même pH que de quelques mV, alors que ceux obtenus avec l'iodure de N_1 -méthyl nicotinamide, voisins des précédents, sont généralement situés entre 100

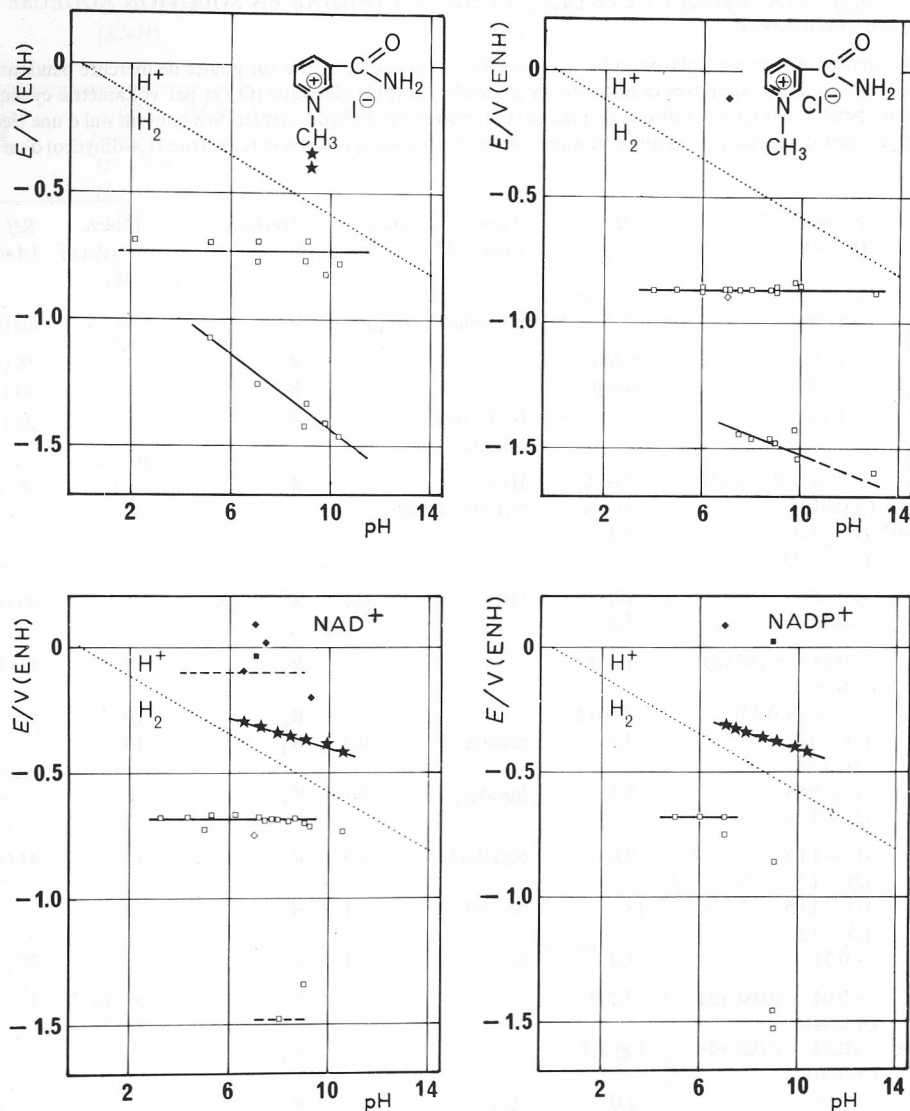


Fig. 2. Potentiels électrochimiques des iodure et chlorure de N_1 -méthyl nicotinamide, du NAD^+ et $NADP^+$ à différents pH en solution aqueuse tamponnée. Potentiels de réduction relevés par polarographie classique (\square), et par voltamétrie sur goutte de mercure pendante (\diamond). Potentiels de réoxydation des composés réduits relevés par polarographie classique (\blacksquare) et par voltamétrie cyclique sur goutte de mercure pendante (\blacklozenge). Potentiels d'oxydo-réduction à courant nul d'une électrode de platine plongée dans des mélanges en quantité équivalente des formes oxydante et réductrice (1,4-dihydro) d'un même dérivé (\star)

et 150 mV au dessus des potentiels obtenus avec le chlorure de N_1 -méthyl nicotinamide. Il faut cependant remarquer que les valeurs de E_1 ont été le plus souvent relevées par des auteurs différents pour l'iode^{6,22} et le chlorure de N_1 -méthyl nicotinamide^{10,18}. Par contre, un même auteur a étudié les trois halogénures de N_1 -méthyl nicotinamide et a constaté que les valeurs relevées des potentiels de demi-vague ne diffèrent pas de plus de 5 mV²¹. Si le substituant méthyl fixé sur l'azote de l'hétéro-

TABLEAU 3

POTENTIELS ÉLECTROCHIMIQUES DES DÉRIVÉS DE LA PYRIDINE EN SOLUTION AQUEUSE À LA TEMPÉRATURE AMBIANTE

Potentiers de réduction relevés par polarographie classique (R_a) et par voltamétrie sur goutte de mercure pendante (R_b). Potentiers de réoxydation des composés réduits relevés par polarographie classique (O_a) et par voltamétrie cyclique sur goutte de mercure pendante (O_b) et sur disque de platine (O_c). Potentiers d'oxydo-réduction à courant nul d'une électrode de platine plongée dans des mélanges, en quantité équivalente, des formes oxydante et réductrice (1,4-dihydro) d'un même dérivé (RO).

Produit	E_3 ou E^0/V (ENH)	pH	Tampons nature et Concn./M	Méthode	Concn. en réactif /M	Réf. (Année)
Pyridine	-1.50	7.0	phosphate, citrate	R_a		60 (1965)
N_1-CH_3	-1.16 -1.24	indép. indép.		R_a R_a		28 (1963) 44 (1948)
$N_1-C_2H_5$	-1.19		NEt_4^+ benzo- sulfonate 0.1	R_a		28 (1963)
2 CO_2H (ac. picolinique)	-0.53 -0.070 pH (± 0.010) (1) -1.27 (2) -1.73	1.0 4.1 et 6.0 9.3	HCl barbital-acétate	R_a		28 (1963)
	-0.65 -0.93	1.0 5.0	HCl	0.1 R_a		60 (1965)
N_1-CH_3 } 2 CO_2H } (homarine)	-0.25 -0.140 pH (± 0.010) -1.05 (± 0.05) (1) -0.8 (2) -1.1 (1) -0.99 (2) -1.29	1.0-5.5 5.5-13 3.9 8.7	acétate borate	0.2 R_a 0.1 R_a	10^{-3} 10^{-3} 10^{-3}	43 (1943)
	(1) -1.05 (2) -1.5 (1) -1.05 (2) -1.5 -0.51	9.0 13 1.0	$NaHCO_3$ NaOH HCl	0.5 R_a 0.1 R_a 0.1 R_a	10^{-3} 10^{-3}	43 (1943)
3 CO_2H (ac. nicotinique)	-0.64 -0.088 pH (± 0.04) -0.64 -0.088 pH (± 0.04) -0.84 -1.22	7.2-9 1 et 8.7 1.0 8-9		R_a R_a HCl borate	5×10^{-6} - 10^{-3}	42 (1941) 28 (1963) 60 (1965)
N_1-CH_3 } 3 CO_2H } (trigonelline)	-1.14	indép.		R_a		28 (1963)
4 CO_2H (ac. isonico- tinique)	-0.55 -0.27 -0.107 pH (± 0.03) (1) -1.24 (2) -1.43 -0.66 (1) -0.95 (2) -1.32 (3) -1.50	1.0 4.1-9 9 1.0 7.0	HCl barbital-acétate	0.1 R_a R_a		28 (1963)
			HCl phosphate-citrate	0.1 R_a		60 (1965)

TABLEAU 3 (continué)

Produit	E_1 ou E^0/V (ENH)	pH	Tampons nature et Concn./M		Méthode	Concn. en réactif/ M	Réf. (Année)
N_1-CH_3 , 4 CO_2H	-0.53 -0.060 pH (± 0.07)	1.0-7.2			R_a	10^{-3}	43 (1943)
	(1) -0.97 (± 0.01) (2) -0.53 -0.060 pH (± 0.07)	7.2-13			R_a	10^{-3}	
	(1) -0.55 (2) -0.98	9.1	Theorell		R_a		28 (1963)
2 $COCH_3$	-0.29 -0.06 -0.086 pH (± 0.02)	2.0 4.0-8.0	Britton-Robinson		R_a R_a		28 (1963)
3 $COCH_3$	-0.54 -0.043 pH (± 0.01)	2.0-6.0	Britton-Robinson		R_a		28 (1963)
	-0.98 (1) -0.48 (2) -0.63	8.0 2	Britton-Robinson		R_a R_a		60 (1965)
	-0.83 -1.16	6 10					
N_1-CH_3 , 3 $COCH_3$	-1.33 �� -1.40 -0.10	7-9	Tris <i>p</i> -phénol sulfonate		R_a dans $H_2O + 20\%$ C_2H_5OH O_a dans $H_2O + 20\%$ C_2H_5OH	2×10^{-4} - 10^{-3}	7 (1964)
N_1 -benzyl, 3 $COCH_3$	-0.64 ~0	7-9	Tris <i>p</i> -phénol sulfonate		R_a dans $H_2O + 20\%$ C_2H_5OH O_a dans $H_2O + 20\%$ C_2H_5OH	2×10^{-4} - 10^{-3}	7 (1964)
4 $COCH_3$	(1) -0.19 (2) -0.29 (1) -0.30 (2) -0.35	2.0 4.0	Britton-Robinson		R_a R_a		28 (1963)
	-0.50 -0.63	6.0 8.0			R_a R_a		28 (1963)
2 $CONH_2$	-0.35 -0.087 pH (± 0.04)	2.5-11.7	Mc. Ilvaine		R_a		28 (1963)
3 $CONH_2$ (nicotinamide)	-1.540 -1.435 -1.407 -1.484 -0.857 -0.012 pH -1.32 -1.45 -1.53 -1.32	13 9.65 8.9 10.3 0.65-5.3 11.65 13 8.7	NaOH NMe_4^+ borate Britton-Robinson Na_2CO_3 NaOH LiCl borate	0.1 0.1 0.1 0.1	R_a R_a R_a R_a R_a R_a R_a R_a R_a	env. 10^{-2} 10^{-3} 2×10^{-4}	33 (1944) 21 (1950) 6 (1960) 9 (1966) 28 (1963) 34 (1968) 35 (1970)
4 $CONH_2$	-0.30 -0.068 pH (± 0.03)	2.3-11.0	Britton-Robinson		R_a		28 (1963)

TABLEAU 3 (continué)

Produit	E_1 ou E^0/V (ENH)	pH	Tampons nature et Concn./M	Méthode	Concn. en réactif/ M	Réf. (Année)
$\text{N}_1\text{-CH}_3, \left. \begin{array}{l} 3 \text{ CONH}_2, \text{I}^- \end{array} \right\}$	$-0.10 -0.042 \text{ pH}$ (± 0.01)	8.53–12.0 12.0		RO	1.3×10^{-3}	20 (1936)
	(1) -0.825	9.65	NMe_4^+ borate	R_a	10^{-3}	21 (1950)
	(2) -1.400 -0.360	9.61	glycine	RO	10^{-3} – 5×10^{-2}	22 (1953)
	(1) -0.70	2.03–9.0		R_a	2×10^{-3}	
	(2) $-0.76 -0.066 \text{ pH}$ (± 0.03)			R_a		
	(1) -0.772	7.0–10.3	Britton–Robinson	R_a		6 (1960)
	(2) -1.423	8.9		R_a		
	(2) -1.463	10.3		R_a		
$\text{N}_1\text{-CH}_3, \left. \begin{array}{l} 3 \text{ CONH}_2, \text{Br}^- \end{array} \right\}$	(1) -0.825	9.65	NMe_4^+ borate	R_a		21 (1950)
	(2) -1.400					
$\text{N}_1\text{-CH}_3, \left. \begin{array}{l} 3 \text{ CONH}_2, \text{Cl}^- \end{array} \right\}$	(1) -0.830	9.65	NMe_4^+ borate	R_a	10^{-3}	21 (1950)
	(2) -1.405					
	(1) -0.87	4–13		R_a	5×10^{-4}	18 (1965)
	(2) $-1.20 -0.031 \text{ pH}$ (± 0.03)	7.5–13				
	-0.895	7	phosphate	0.2 R_b	10^{-3}	10 (1967)
	-0.11	7	phosphate	0.2 O_b		
$\text{N}_1\text{C}_2\text{H}_5, \left. \begin{array}{l} 3 \text{ CONH}_2, \text{I}^- \end{array} \right\}$	(1) -0.818	9.65	NMe_4^+ borate	R_a	10^{-3}	21 (1950)
	(2) -1.408					
$\text{N}_1\text{C}_2\text{H}_5, \left. \begin{array}{l} 3 \text{ CONH}_2, \text{Br}^- \end{array} \right\}$	(1) -0.828	9.65	NMe_4^+ borate	R_a	10^{-3}	21 (1950)
	(2) -1.412					
$\text{N}_1\text{C}_2\text{H}_5, \left. \begin{array}{l} 3 \text{ CONH}_2, \text{Cl}^- \end{array} \right\}$	(1) -0.823	9.65	NMe_4^+ borate	R_a	10^{-3}	21 (1950)
	(2) -1.408					
	(1) -0.855	7	phosphate	R_b		10 (1967)
	(2) -0.895 -0.11	7	phosphate	O_b		
$\text{N}_1\text{C}_3\text{H}_7, \left. \begin{array}{l} 3 \text{ CONH}_2, \text{I}^- \end{array} \right\}$	(1) -0.744	3.8–10.3	Britton–Robinson	R_a		6 (1960)
	(2) -1.466	8.9		R_a		
	(2) -1.471	10.3		R_a		
$\text{N}_1\text{C}_3\text{H}_7, \left. \begin{array}{l} 3 \text{ CONH}_2, \text{Cl}^- \end{array} \right\}$	(1) -0.845	7	phosphate	R_b		10 (1967)
	(2) -0.915 -0.11	7		O_b		
$\text{N}_1\text{C}_4\text{H}_9, \left. \begin{array}{l} 3 \text{ CONH}_2, \text{I}^- \\ \text{Br}^- \\ \text{Cl}^- \end{array} \right\}$	(1) -0.808	9.65	NMe_4^+ borate	R_a	10^{-3}	21 (1950)
	(2) -1.413					
$\text{N}_1\text{-benzyl, } \left. \begin{array}{l} \text{CONH}_2, \text{I}^- \end{array} \right\}$	(1) $-0.746 (\pm 0.003)$	7.0–10.3	Britton–Robinson	R_a		6 (1960)
	(2) -1.496	8.9		R_a		
	(2) -1.493	10.3		R_a		

(continué)

TABLEAU 3 (continué)

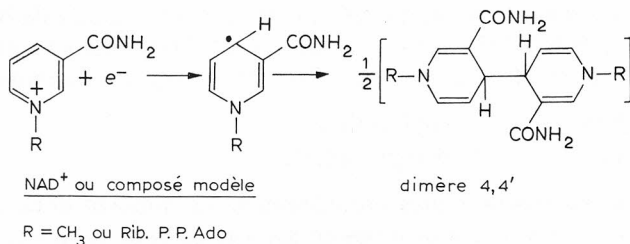
Produit	E_1 ou E^0/V (ENH)	pH	Tampons nature et Concn./M		Méthode	Concn. en réactif/ M	Réf. (Année)
N_1 -benzyl, 3 CONH ₂ , Cl ⁻	(1) - 0.755 ± 0.005	3.8-10.3	Britton-Robinson		R _a		6 (1960)
	(2) - 1.498	8.9					
	(2) - 1.517	10.3					
	-0.755 et - 0.905	7.0	phosphate		R _b		10 (1967)
	-0.11	7.0	phosphate		O _b		
NAD ⁺	-0.74	10.3-10.6	tris	0.5	R _a	3×10^{-5} -4×10^{-4}	1 (1955)
	-0.701	6-9	NH ₄ ⁺ /NH ₃	0.2	R _a	2×10^{-4}	2 (1955)
	-0.105 ₅ - 0.0303 pH (± 0.003)	6.5- 10.5	EDTA, tris, glycine	0.1	RO	3×10^{-4} - 10^{-3}	3 (1955)
	+0.011	7.4	NH ₄ ⁺ /NH ₃		O _a		4 (1956)
	(1) - 0.69 (± 0.02)	3.2-9.2	tris, phosphate, 0.1 citrate	0.1	R _a	3.7×10^{-4} -6×10^{-3}	5 (1956)
	(2) - 1.14	4.96	NMe ₄ ⁺ Cl ⁻	0.3	R _a		
	-0.03	7	tris	0.1	O _a	10^{-3}	
	(1) - 0.874	8.	Britton-Robinson		R _a		6 (1960)
	(2) - 1.345						
	-0.67	4-9	tris, H ₂ O + 20 % <i>p</i> -phénol sulfonate, C ₂ H ₅ OH acétate	R _a		2×10^{-4} - 5×10^{-3}	7 (1964)
	-0.10		<i>id.</i>		O _a		
	(1) - 0.69	4-9	acetate, citrate, phosphate, pyrophos.		R _a	10^{-4} - 10^{-3}	8 (1965)
	(2) - 1.48 ± 0.01	7-9	NBu ₄ ⁺ CO ₃ ²⁻		R _a		
	-0.88		phosphate, carbonate		R _a		
	-0.01	7.8 et 9			O _a		
	-0.735	10.6			R _a	2×10^{-4}	9 (1966)
	-0.750	7	phosph.		R _b		10 (1967)
	+0.09				O _b		
	-0.315	7			RO		28 (1963)
	-0.73		tris	0.5	R _a		
	0.00	7.4	phosphate	0.1	O _a	10^{-3} - 10^{-2}	50 (1968)
NADH	+ 1.29	6			O _c		8 (1965)
NMN ⁺	-0.90	10.3-	tris	0.5	R _a	10^{-4} -	1 (1955)
		10.6				5×10^{-4}	
NADP ⁺	-0.99	10.3-	tris	0.5	R _a	2×10^{-5} -	1 (1955)
		10.6				4×10^{-4}	
	-0.106 ₂ - 0.0301 pH (± 0.002)	7-10.3	tris, glycine	0.1	RO	2- 6×10^{-4}	13 (1959)
	-0.98	10.0- 10.6			R _a		28 (1963)
	(1) - 0.68				R _a		16 (1967)
	(2) - 1.46						

TABLEAU 3 (continué)

Produit	E_1 ou E^0/V (ENH)	pH	Tampons nature et Concn./M		Méthode	Concn. en réactif/ M	Réf. (Année)
	-0.755 +0.09	7			R _b O _b		10 (1967)
	(1) -0.68	5.6-7	acétate, citrate, phosphate, pyrophosph.	0.2	R _a citrate,	5×10^{-4}	17 (1966)
	-0.86 (2) -1.46	9	NBu ₄ ⁺ CO ₃ ²⁻ pyrophosph.	0.2	R _a	5×10^{-4}	
NADPH	+0.861	9			O _c		17 (1966)
2 CHO	-0.06 -0.079 pH (±0.03)	2.0 4.0 6.0	Britton-Robinson		R _a		28 (1963)
3 CHO	-0.34 -0.062 pH (±0.01)	2.0 4.0 6.0	Britton-Robinson		R _a		28 (1963)
4CHO	(1) +0.22 -0.082 pH (±0.02) (2) +0.05 -0.081 pH (±0.01)	2.0 4.0 6.0	Britton-Robinson		R _a		28 (1963)
2CN	-1.00 -1.19 -0.98 -1.46	2.0 4.0 8.0 2 10	Britton-Robinson		R _a		28 (1963)
			Britton-Robinson		R _a		60 (1965)
3 CN	-0.78 -0.87 -1.25	2.0 4.0 8.0	Britton-Robinson		R _a		28 (1963)
N ₁ -CH ₃ , 3CN I ⁻	-0.64 -0.01	7-9	tris, p-phénol sulfonate	H ₂ O + 20% C ₂ H ₅ OH	R _a O _a	2×10^{-4} - 10^{-3}	7 (1964)
N ₁ -benzyl, 3 CN, Cl ⁻	-0.54	7-9	tris, p-phénol sulfonate	H ₂ O + 20% C ₂ H ₅ OH	R _a	2×10^{-4} - 10^{-3}	7 (1964)
4CN	-0.36 -0.073 pH (±0.01) -1.09	2.0 4.0 8.0 supérieur à 9.0			R _a		28 (1963)
2 NO ₂	+0.31 -0.059 pH (±0.02)	4-9.6	Mc Ilvaine, glycine		R _a		28 (1963)
3 NO ₂	+0.24 -0.056 pH (±0.02)	4-9.6	Mc Ilvaine, glycine		R _a		28 (1963)
4NO ₂	+0.31 -0.049 pH (±0.02) +0.17	4.0 5.1 9.6 7.0	Mc Ilvaine, glycine		R _a		28 (1963)

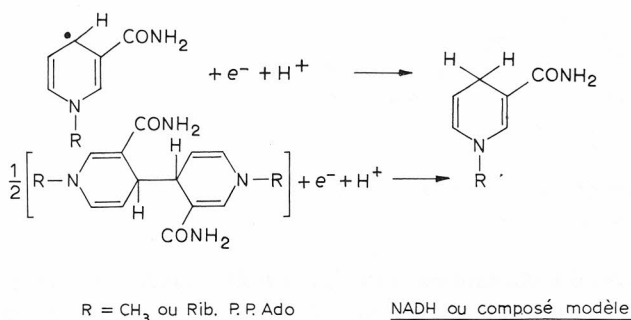
cycle est remplacé par les substituants éthyl, n-propyl, n-butyl ou benzyl, les potentiels, à un même pH, varient de moins de 50 mV^{6,7,10,14}. L'étude spectrophotométrique et l'analyse chimique des produits de réactions d'électrolyse à potentiel contrôlé donnent pour tous les composés précédents des résultats cohérents.

En milieu légèrement acide, neutre ou basique, la réduction électrochimique se fait donc en deux étapes. Durant la première étape un transfert simple d'un électron fournirait un radical qui ensuite se dimériserait selon :



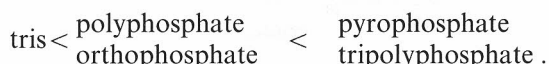
Malgré la divergence de quelques résultats^{5,7}, on constate en fait bien dans les travaux les plus récents sur les NAD^+ , NADP^+ et leurs composés modèles que l'analyse mathématique de la forme de cette première vague de réduction et que les coulométries au potentiel de celle-ci conduisent en définitive à un même échange global d'un électron par molécule de réactif^{2,8,17,18,50}. Le dimère 4,4' a pu être préparé par réduction électrochimique à potentiel contrôlé sur le palier de diffusion de la première vague, puis isolé et analysé^{18,50}. La vitesse de dimérisation a été évaluée par variation du potentiel de pic avec la vitesse de balayage en voltamétrie sur goutte de mercure pendante¹⁰ et par étude de la cinétique de capture par le NAD^+ (ou un composé modèle) d'électrons hydratés produits par radiolyse pulsée⁵¹. Les valeurs obtenues par ces deux méthodes sont du même ordre de grandeur pour le NAD^+ , respectivement 8.5×10^6 et $5.6 \times 10^7 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, alors que celles obtenues pour le N_1 -méthyl nicotinamide sont très différentes entre elles, respectivement 2.2×10^{-2} et $6.9 \times 10^{+7} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La deuxième vague observée dans la réduction électrochimique ferait intervenir simultanément deux réactions: la réduction à un électron et un proton du radical formé pendant la première étape et une lente réduction à deux électrons et deux protons du dimère :



On constate en fait par coulométrie au potentiel de cette deuxième vague que la réduction électrochimique des NAD^+ et NADP^+ conduit à un échange global de moins de deux électrons par molécule de réactif¹⁷, alors que celle du chlorure de N_1 méthyl nicotinamide conduit à un échange global d'exactement deux électrons par molécule de réactif¹⁸.

Les rendements en l'isomère dihydro biologiquement actif, le 1,4-dihydro, formé par électrolyse au potentiel de la deuxième vague, dépendent fortement de la nature de l'électrode, du pH de la solution et même de la nature du tampon fixant ce pH. Par exemple, pour des électrolyses de 87–100% d'une quantité initiale de NAD^+ , il ne se forme que 3–80% de NADH ¹¹. Les rendements en NADH augmentent, pour les électrodes, dans l'ordre⁵²: Hg , Pd , Ni , $\text{Ag} < \text{Pt} < \text{Pb}$ et pour les tampons^{11,12}:

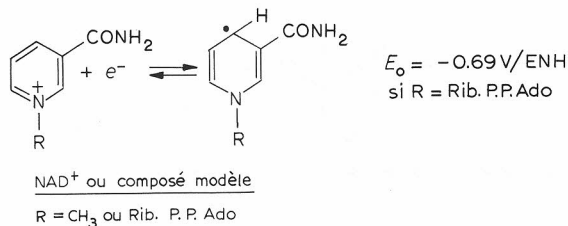


Les deux schémas de réaction cités précédemment ne donnent donc qu'une représentation très partielle des réactions mises en jeu lors de la deuxième étape de réduction. Les caractéristiques tant cinétiques que surtout énergétiques de ces réactions sont également encore mal connues. Enfin l'hypothèse de l'existence d'une réaction de dimérisation repose essentiellement sur les résultats de macroélectrolyses à potentiel contrôlé; cette hypothèse n'a semble-t-il jamais été vérifiée par l'analyse de l'influence des différents facteurs expérimentaux (concentration de réactifs, temps de goutte...) sur les courbes intensité-potential relevées.

2.2. Oxydation électrochimique des composés réduits

La plupart des recherches effectuées jusqu'à présent sur le comportement électrochimique des NAD^+ , NADP^+ et de leurs composés modèles ont été limitées à la réduction de ces dérivés pyridiniques. Ce n'est souvent qu'incidemment qu'ont été relevées quelques caractéristiques électrochimiques des différentes formes réduites (radical libre, dimère et 1,4-dihydro).

Les propriétés en réoxydation du radical libre, formé par l'addition d'un électron lors de la première étape de réduction, ont été détectées par Underwood *et al.* par voltamétrie cyclique sur goutte de mercure pendante avec un balayage anodique de retour très rapide ($20\text{--}50 \text{ V s}^{-1}$)^{10,16}. On observe alors un pic anodique décalé de $10\text{--}50 \text{ mV}$ seulement par rapport au pic cathodique, ce qui illustre la réversibilité du transfert électronique impliqué. On pourrait alors écrire du point de vue des bilans électrochimiques d'énergie:



La durée de vie de ce radical a été estimée à quelques millisecondes en mesurant le temps au bout duquel il n'est plus détectable par oxydation anodique. Une valeur si

faible explique l'impossibilité à laquelle se sont heurtés ces auteurs pour le détecter par résonance paramagnétique électronique, lors d'une électrolyse au potentiel de la première vague de réduction¹⁸.

Par réaction chimique ce radical donne un composé pratiquement stable: réoxydable par voltamétrie cyclique sur goutte de mercure pendante à toutes vitesses de balayage anodique retour, ce composé peut être préparé quantitativement par électrolyse au potentiel de la première étape de réduction^{18,50}. Les mesures osmométriques et d'équilibre de sédimentation ont montré que ce composé a une masse moléculaire double de celle du produit initial. Sa structure de dimère 4,4' a été enfin suggérée par son spectre d'absorption ultraviolette. Ce dimère est alors réoxydable globalement en NAD^+ , NADP^+ ou composé modèle, sur électrode à goutte de mercure tombante ou pendante ou sur électrode à disque de platine stationnaire. Cette oxydation est effective à environ $+0.10 \text{ V/ENH}$ si le dimère est dérivé du NAD^+ et NADP^+ , et à environ -0.10 V/ENH si le dimère est dérivé d'un sel de N_1 -alkyl nicotinamide¹⁰ (Tableaux 2 et 3 et Fig. 2). Aucune étude de l'influence du pH sur cette réoxydation n'a été jusqu'à présent effectuée.

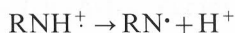
Il n'existe que très peu de données sur l'oxydation électrochimique de NADH , NADPH ou de leurs composés modèles dans l'eau. Les quelques valeurs obtenues sur électrode de platine indiquent que le potentiel d'oxydation est très élevé ($+1.29 \text{ V/ENH}$ à pH 6 pour NADH ⁸ et $+0.86 \text{ V/ENH}$ à pH 9 pour NADPH ¹⁷). Très récemment Haas^{53,54} a étudié l'oxydation de composés modèles du NADH dans l'acétonitrile et ses résultats expérimentaux excluent que l'oxydation sur électrode de platine s'effectue par un mécanisme à deux électrons. En effet, la première étape d'oxydation est toujours un transfert d'un électron formant un radical pyridinyl protoné:



Ce radical RNH^+ subirait des transferts ultérieurs d'électrons et de protons variant suivant les conditions de pH. En effet, en milieu non tamponné RNH^+ se dismuterait en formant le sel de pyridinium RN^+ (analogue à NAD^+) et la forme protonée du réactif initial RNH_2^+ , selon:



En présence de base, l'intermédiaire radicalaire RNH^+ perdrait son proton en donnant le radical RN^\bullet qui s'oxyderait immédiatement en RN^+ au même potentiel selon:

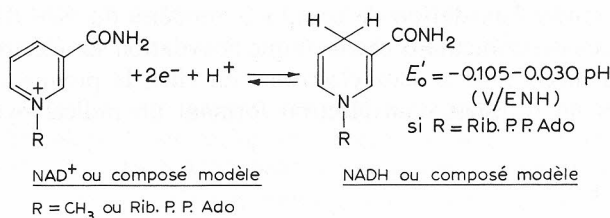


2.3. Comportement potentiométrique de mélanges de NAD^+ et NADH ou de composés modèles

Le comportement potentiométrique de mélanges des formes oxydantes et réductrices NAD^+/NADH ou $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ou encore sel de N_1 -méthyl nicotinamide/1,4-dihydro N_1 -méthyl nicotinamide, qui constituent les formes qui interviennent effectivement *in vivo*, est assez bien connu car il a été souvent étudié depuis les travaux de Karrer en 1936^{19,20}. Les formes réduites sont préparées soit enzymati-

quement (alcool déhydrogénase+éthanol), soit chimiquement par le dithionite $S_2O_4^{2-}$ ou le borohydrure, de façon à obtenir l'isomère 1,4-dihydro. Le potentiel à courant nul d'une électrode métallique d'or ou de platine, plongée dans de telles solutions, se stabilise très lentement. Le potentiel d'équilibre est atteint plus rapidement en présence de médiateur redox constitué par des colorants comme le benzyl viologène et la rosinduline 2G, de potentiel normal voisin de celui de $NAD^+/NADH^{22,55}$. C'est pourquoi les nucléotides pyridiniques sont souvent classés du point de vue biochimique comme des réactifs rédox actifs en présence de médiateurs, à la différence des nucléotides flaviniques ou des porphyrines qui sont actifs même sans médiateur, et des couples substrat/substrat-réduit, tels que succinate/fumarate ou lactate/pyruvate, qui ne sont actifs qu'en présence à la fois de médiateur et d'enzyme. Il faut cependant noter que les études de Rodkey *et al.* sur le comportement potentiométrique de mélanges de $NAD^+/NADH^3$ et de $NADP^+/NADPH^{13}$ ont toujours été effectuées en présence simultanée de médiateur et d'enzyme (xanthine oxydase).

Le potentiel normal ainsi relevé par potentiométrie pour ces différents couples de nucléotides pyridiniques, c'est-à-dire le potentiel obtenu lorsque la concentration de la forme oxydée est égale à celle de la forme réduite, diminue de 30 mV lorsque le pH augmente d'une unité (Fig. 2). Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'un échange de deux électrons et d'un proton conduisant à la réaction globale^{3,13,22}:



Ce potentiel normal est utilisé depuis de nombreuses années pour expliquer le comportement oxydo-réducteur des coenzymes pyridiniques^{26,55-58}. Il est très important de noter qu'il est, à pH 7, situé à environ 100 mV au dessus du potentiel normal du couple $H^+/\frac{1}{2}H_2$ qui constitue la limite inférieure du domaine thermodynamique d'électroactivité dans l'eau (Fig. 2). Il est par conséquent situé à peu près à mi-chemin à la fois entre les potentiels de la première étape de réduction ($NAD^+ \rightarrow$ radical ou dimère) et de la première étape d'oxydation (radical ou dimère $\rightarrow NAD^+$), et entre les potentiels de la deuxième étape de réduction ($NAD^+ \rightarrow NADH$) et de la deuxième étape d'oxydation ($NADH \rightarrow NADH^+$).

2.4. Conclusion

Il apparaît ainsi que plusieurs des auteurs qui ont étudié les propriétés électrochimiques des coenzymes pyridiniques, ont proposé d'attribuer chaque potentiel de demi-vague relevé par polarographie à une étape réactionnelle, différente de la transition globale $NAD^+/NADH$, et définie par sa stoechiométrie. Cette stoechiométrie a été souvent déduite de l'analyse des produits de réaction formés par une coulométrie à potentiel contrôlé. Une telle façon de procéder introduit deux risques d'erreurs considérables en ce qui concerne l'interprétation des phénomènes observés en terme de mécanisme moléculaire.

En premier lieu les diverses hypothèses faites pour chaque vague polarographique et pour les relevés potentiométriques, l'ont toujours été en complète indépendance les unes des autres; c'est ainsi que nous avons relevé dans les publications relatives au NAD^+ que:

- (A) $\text{NAD}^+ + e^- \rightleftharpoons \text{NAD}^\bullet \rightarrow \frac{1}{2} \text{NAD-NAD}$ à -0.69 V/ENH
- (B) $\text{NAD}^\bullet + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADH}$ }
 ou } à environ -1.3 V/ENH à pH 7
 $\text{NAD-NAD} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{NADH}$
- (C) $\text{NAD}^+ + 2e^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NADH}$ à $(-0.105-0.030 \text{ pH}) \text{ V/ENH}$
- (D) $\text{NAD-NAD} \rightleftharpoons 2 \text{NAD}^+ + 2e^-$ à environ 0 V/ENH à pH 7
- (E) $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+ + e^- + \text{H}^+$ à environ $+1.1 \text{ V/ENH}$ à pH 6

Or il est évident que si la première hypothèse est retenue pour la réaction (B), les trois premières réactions sont incompatibles puisque le potentiel de la réaction (C) devrait être théoriquement la moyenne des potentiels des réactions (A) et (B).

La raison d'être de telles incompatibilités apparaît dès lors que le second type d'erreur commise est mis en évidence. Au cours d'une transformation rédox dont le résultat global est déterminé ultérieurement par analyse et qui apparaît à un potentiel donné, l'étape réactionnelle qui fixe la valeur du potentiel ne représente souvent qu'une partie de la transformation globale observée. C'est ainsi qu'il s'agit en général d'électronation simple ou d'électronation consécutive à une protonation. Le processus de formation du produit primaire définit la valeur du potentiel à un niveau qui implique, en général, un investissement énergétique supérieur à celui qui correspondrait au bilan énergétique global de formation du produit détecté. Ce processus directeur est alors suivi d'une ou plusieurs étapes chimiques ou électrochimiques qui ne jouent dans la définition du potentiel de réaction qu'un rôle limité aux effets de concentration qu'elles impliquent quant aux produits intermédiaires (exemple: dimérisation radicalaire).

Enfin il ne faut pas oublier, en tant que cause de divergence au niveau des interprétations, toutes les erreurs qui pourraient être commises en rapprochant les uns des autres des résultats obtenus par des expériences différentes. Celles-ci peuvent en effet diverger simplement parce que l'influence de certaines données expérimentales (nature et concentration des tampons, température, conditions polarographiques, état de l'électrode de référence, ...) n'a pas été explicitée. C'est ainsi que certains auteurs^{6,18,22} ont relevé des valeurs de $E_{\frac{1}{2}}$ qui diffèrent notablement d'un halogénure de N_1 -méthyl nicotinamide à l'autre (Fig. 2), alors que le seul auteur qui ait étudié comparativement les trois halogénures²¹ trouve à pH 9.65 une excellente concordance entre les $E_{\frac{1}{2}}$ de ceux-ci. Il est possible que cette divergence de résultats soit due à l'influence de la nature des tampons car les premiers auteurs ont utilisé, à pH compris entre 9 et 10, des tampons contenant de l'ammoniac ou des sels alcalins d'acide orthophosphorique ou de glycine alors que le dernier auteur a utilisé un borate de $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

En conclusion, pour accéder à une connaissance des mécanismes d'oxydo-réduction des coenzymes pyridiniques telle que les hypothèses faites puissent être considérées comme solides, car compatibles les unes avec les autres, de nombreuses données sont encore absentes ou insuffisantes.

Nous avons donc décidé de combler au moins partiellement cette lacune en cherchant à disposer de données concernant tous les processus électrochimiques qui définissent les propriétés d'oxydo-réduction des coenzymes pyridiniques⁵⁹.

Cette prise de position est justifiée en outre par l'importance que doit revêtir la connaissance précise des propriétés oxydo-réductrices du NAD^+ et de ses dérivés réduits pour ce qui concerne l'interprétation du rôle biologique joué par ces composés. Lorsque ces données seront réunies, elles devraient permettre d'une part de définir plus précisément les conditions d'action du NAD^+ et du NADH sur les différents substrats biologiques avec lesquels ils réagissent *in vivo*. Elles devraient permettre en second lieu de comprendre pourquoi et comment la mise en oeuvre des propriétés rédox du couple NAD^+/NADH dans la chaîne de transfert des électrons, aboutit à la mise en réserve, sous forme de triphosphonucléotides, d'une part de l'énergie d'oxydo-réduction engagée.

RÉSUMÉ

L'analyse critique des données antérieures relatives à l'électrochimie des coenzymes pyridiniques, de leurs composés modèles (N_1 -alkyl nicotinamide) et plus généralement des pyridines substituées, nous a montré qu'il subsiste encore beaucoup de difficultés et d'imprécisions dans la connaissance des propriétés oxydo-réductrices de ces matériaux. Nous avons, par exemple, relevé la différence fondamentale qui existe entre les résultats obtenus par des méthodes voltamétriques relativement rapides (polarographie et voltamétrie cyclique) et ceux obtenus avec des mesures potentiométriques au cours de lentes titrimétries rédox. La source de ces différences de comportement, liée aux mécanismes mis en oeuvre, n'a pas été jusqu'à présent élucidée.

SUMMARY

Literature data relating to the electrochemical properties of pyridine coenzymes, their prototype (N_1 -alkylnicotinamide) and more generally substituted pyridines have been examined. This review shows the numerous difficulties encountered in the understanding of the electrochemical properties of these compounds and illustrates the limits of present knowledge in this field. It points out, for example, the fundamental discrepancy between results obtained with relatively fast methods (polarography, cyclic voltammetry...) and those obtained using slow redox titrations. The origin of these discrepancies and their connection with the mechanisms involved has not yet been fully explained.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. Carruthers et J. Tech, *Arch. Biochem. Biophys.*, 56 (1955) 441.
- 2 V. Moret, *G. Biochim.*, 4 (1955) 192.
- 3 F. L. Rodkey, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 777.
- 4 V. Moret, *G. Biochim.*, 5 (1956) 318.
- 5 B. Ke, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 547.
- 6 J. Nakaya, *Nippon Kagaku Zasshi*, 81 (1960) 1459.

J. Electroanal. Chem., 39 (1972)

- 7 J. Bergman in G. J. Hills (Ed.), *Proceedings IIIrd International Congress of Polarography*, 1964, Vol. II., Mc Millan, London, 1966, pp. 985–991.
- 8 J. M. Burnett et A. L. Underwood, *Biochem.*, 4 (1965) 2060.
- 9 V. P. Skulachev et L. I. Denisovitch, *Biokhimiya*, 31 (1966) 132.
- 10 A. J. Cunningham et A. L. Underwood, *Biochem.*, 6 (1967) 266.
- 11 R. F. Powning et C. C. Kratzing, *Arch. Biochem. Biophys.*, 66 (1951) 249.
- 12 T. Kono et S. Nakamura, *Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 22 (1958) 399.
- 13 F. L. Rodkey et J. A. Donovan, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 677.
- 14 B. Janik et P. J. Elving, *Chem. Rev.*, 68 (1968) 295.
- 15 I. Yamazaki, K. Yokota et R. Nakajima *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 21 (1965) 582.
- 16 A. J. Cunningham, *Diss. Abstr.*, 27 B (1967) 2265.
- 17 A. J. Cunningham et A. L. Underwood, *Arch. Biochem. Biophys.*, 117 (1966) 88.
- 18 J. N. Burnett et A. L. Underwood *J. Org. Chem.*, 30 (1965) 1154.
- 19 P. Karrer et F. Blumer, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 1157.
- 20 P. Karrer, G. Schwarzenbach, F. Benz et U. Solmssen, *Helv. Chim. Acta*, 19 (1936) 811.
- 21 W. Ciusa, P. M. Strocchi et G. Adamo, *Gazz. Chim. Ital.*, 80 (1950) 604.
- 22 S. J. Leach, J. H. Baxendale et M. G. Evans, *Aust. J. Chem.*, 6 (1953) 395.
- 23 J. N. Burnett, *Diss. Abstr.*, 26 (1965) 1888.
- 24 B. Ke, *Arch. Biochem. Biophys.*, 60 (1956) 505.
- 25 A. N. Kotelnikova et V. V. Solomatina, *Biokhimiya*, 30 (1965) 816.
- 26 P. A. Loach, *Handbook of Biochemistry*, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1968, pp. J.27–J. 34.
- 27 J. Kuta et J. Drabek, *Chem. Listy*, 49 (1955) 23.
- 28 J. Volke in A. R. Katritzky (Ed.), *Physical Methods in Heterocyclic Chemistry*, Vol. I, Academic Press, London, 1963, pp. 296–297.
- 29 J. Volke, *Talanta*, 12 (1965) 1081.
- 30 R. Kalvoda, *Chem. Zvesti*, 18 (1964) 347.
- 31 C. Parkanyi et R. Zahradnik, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 73 (1964) 57.
- 32 R. Kalvoda, *Chem. Zvesti*, 18 (1964) 347.
- 33 K. Wenig et M. Kopecký, *Chem. Zentralbl.*, 1 (1944) 34.
- 34 Y. Okazaki, J. Otsuki, K. Miyasaka et J. Nabikawa, *Jap. Anal.*, 17 (1968) 1228.
- 35 R. Pointeau et J. Bonastre, *Eléments de Polarographie*, Masson, Paris, 1970, p. 316.
- 36 F. Šorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 13 (1948) 57.
- 37 K. Wallenfels et M. Gellrich, *Ber.*, 92 (1959) 1406.
- 38 Y. Paiss et G. Stein, *J. Chem. Soc.*, (1958) 2905.
- 39 G. Stein et G. Stiasny, *Nature*, 176 (1955) 734.
- 40 A. J. Swallow, *Biochem. J.*, 60 (1955) 443.
- 41 M. B. Yarmolinsky et S. P. Colowick, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 177.
- 42 J. J. Lingane et O. L. Davis, *J. Biol. Chem.*, 137 (1941) 567.
- 43 P. C. Tompkins et C. L. A. Schmidt, *Univ. Calif. (Berkeley), Publ. Physiol.*, 8 (1943) 237.
- 44 F. Šorm et Z. Šormova, *Chem. Listy*, 42 (1948) 82.
- 45 A. M. Wilson et D. G. Epple, *Biochem.*, 5 (1966) 3170.
- 46 *Handbook of Chemistry and Physics*, The Chemical Rubber Co, Cleveland, Ohio, 1967–1968, pp. D. 87–D. 91.
- 47 W. P. Jencks et J. Regenstein, *Handbook of Biochemistry*, The Chemical Rubber Co, Cleveland, Ohio, 1968, pp. J. 150–189.
- 48 A. Albert in A. R. Katritzky (Ed.), *Physical Methods in Heterocyclic Chemistry*, Academic Press, London, 1963, pp. 1–108.
- 49 D. D. Perrin, *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*, Butterworths, London, 1965.
- 50 R. W. Burnett et A. L. Underwood, *Biochem.*, 7 (1968) 3328.
- 51 E. J. Land et A. J. Swallow, *Biochim. Biophys. Acta*, 162 (1968) 327.
- 52 B. Ke, *J. Amer. Chem. Soc.*, 78 (1956) 3649.
- 53 R. G. Haas, *Diss. Abstr.*, 31 (1970) 1777B.
- 54 W. J. Blaedel et R. G. Haas, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 918.
- 55 E. S. Guzman Barron, *Physiol. Rev.*, 19 (1939) 184.
- 56 J. Polonovski in *Traité de Biochimie Générale, Tome II*, Masson, Paris, 1964, fasc. 2, pp. 566–678.
- 57 T. Bruice et S. J. Benkovic, *Biorganic Mechanisms, Vol. II*, W. A. Benjamin, Inc., New York, Amsterdam, 1966, pp. 301–349.

- 58 H. Sund in (Ed.), T. P. Singer, *Biological Oxidations*, Interscience, New York, London, 1968, pp. 603–639.
- 59 D. Thévenot et R. Buvet, *J. Electroanal. Chem.*, 39 (1972) 447.
- 60 L. Meites, *Polarographic Techniques*, Interscience Publishers, London, 2nd ed., 1965, p. 706.
- J. Electroanal. Chem.*, 39 (1972)